

定量的RT-PCR法による再生不良性貧血における造血幹細胞の特性に関する検討

著者	藤巻 慎一
号	3275
発行年	2002
URL	http://hdl.handle.net/10097/22382

氏 名（本籍）	ふじ 藤	まき 巻	しん 慎	いち 一
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 第 3 2 7 5 号			
学位授与年月日	平 成 14 年 3 月 6 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	平 成 13 年 3 月 26 日 東北大学大学院情報科学研究科 博士課程後期 3 年の課程 人間社会情報科学専攻修了			
学 位 論 文 題 目	定量的RT-PCR法による再生不良性貧血における 造血幹細胞の特性に関する検討			

	(主 査)			
論 文 審 査 委 員	教授 佐々木	毅	教授 賀 来 満 夫	
	教授 土 屋	滋	教授 服 部 俊 夫	

論文内容要旨

背景と目的

再生不良性貧血は骨髓の低形成を伴う造血能の低下と末梢血液における汎血球減少を主徴とする疾患群である。その多くは後天性であり、その発症メカニズムの詳細はいまだ不明な点が多い。近年、本態性再生不良性貧血の病態に関する多くの研究がなされ、免疫抑制療法による臨床的効果とあわせ、多くの再生不良性貧血は免疫学的機序による造血幹細胞の傷害に起因すると考えられている。さらに、傷害を受けた造血幹細胞の多くが apoptosis に陥っていると報告され、再生不良性貧血の重症度と apoptosis の関連性も指摘されている。

一方、一部の患者では免疫抑制療法に反応しない場合があり、本疾患における発症メカニズムの多様性が考えられる。近年、造血の初期段階に機能し、造血発生を制御する幾つかの転写因子が明らかになりつつある。これらの転写因子において、*GATA-2*、*AML1* および *SCL* は、多くの研究成果から造血発生だけではなく成体の造血においても必須であることが知られてきた。従って、造血幹細胞の増殖分化におけるこれらの転写因子の発現異常と再生不良性貧血などの骨髓機能不全との関連が推定される。そこで、本研究では再生不良性貧血症例の造血幹細胞を研究対象とし、上記の各転写因子の発現と本疾患の関連性を明らかにすることを目的とした。

方法

1) 培養細胞株は、HL-60, KG-1a, K562 および NALM-6 を使用した。臨床検体としては、再生不良性貧血 (aplastic anemia) 24 例 (中等症 14 例, 重症 10 例), 特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP) 17 例, 骨髓異形成症候群の不应性貧血 (myelodysplastic syndrome-refractory anemia : MDS-RA) 12 例から採取された骨髓血 (bone marrow : BM) を使用した。さらに、非造血器腫瘍患者の骨髓血 14 例を正常例として使用した。全ての検索は、材料を提供された患者からインフォームドコンセントを得た上で実施した。さらに、本研究のプロトコールは東北大学医学部倫理委員会において承認された。

2) 臨床検体の骨髓血から単核細胞を採取後、MACS システムにて CD34 陽性細胞を選択的に分離し、残りの細胞は CD34 陰性細胞として用いた。

3) 各試料から total RNA を抽出後、転写因子である *GATA-2*、*AML1* および *SCL* 各遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR にて測定した。

結 果 と 考 察

最初に、定量的 RT-PCR の測定系を確立し、この測定系が *GATA-2* mRNA, *AML1* mRNA および *SCL* mRNA の発現量の高感度かつ正確な定量法であることを確認した。また、MACS システムによる CD34 陽性細胞の分離能を検討し、選択的に分離された CD34 陽性細胞の純度が95%以上と良好であることを示した。

次に、臨床検体を用いて検討した。すなわち、再生不良性貧血例の CD34 陽性細胞における *GATA-2* mRNA 発現量は、対照疾患と比べて有意に低下しており ($p<0.01$)、その傾向は免疫細胞化学染色による細胞あたりの GATA-2 蛋白の検出においても同様であった。さらに、コロニーアッセイとの比較により、造血幹細胞のコロニー数と *GATA-2* mRNA 発現量との関連が示唆された。しかし、再生不良性貧血の重症度による比較では明らかな差異は認められなかった。一方、CD34 陽性細胞における *AML1* mRNA および *SCL* mRNA の発現量では他の疾患群との間に発現量の差異はなく、一定の傾向は認められなかった。さらに、免疫抑制剤である cyclosporin A の投与による *GATA-2* mRNA 発現量の変化は認められなかった。以上の結果から、再生不良性貧血において、造血幹細胞の転写因子の異常、すなわち *GATA-2* mRNA の発現量の低下が造血幹細胞における成熟異常とその維持に関与することが推定された。

今後の課題として、再生不良性貧血の造血幹細胞における *GATA-2* 発現量の低下が外因的な免疫学的機序に依存しているか否かを確認するために、治療した症例における *GATA-2* mRNA 発現量のモニタリングや予後との関連性を検討することが必要であろう。

審 査 結 果 の 要 旨

再生不良性貧血は骨髓の低形成を伴う造血能の低下と末梢血液における汎血球減少を主徴とする疾患群である。本疾患は骨髓における多能性造血幹細胞の減少により生じるとされ、多くの例では、免疫学的機序による幹細胞への傷害がその原因であると考えられている。但し、この仮説の根拠は専ら、臨床的な免疫抑制剤の有効性に負うところが多く、再生不良性貧血の発症機序について科学的な解明は未だ不十分と言える。本研究は、再生不良性貧血における造血幹細胞そのものに関する特性をより詳細に特徴づけることにより、再生不良性貧血の根本的な発症機序を明らかにしようとする研究である。本申請者は、幹細胞レベルで機能する転写因子の発現異常により造血幹細胞の機能異常が、さらには再生不良性貧血の病態が形成されるという大胆な仮説の元に、再生不良性貧血の造血幹細胞の特性解明のためのアプローチとして、CD 34 陽性細胞におけるこれらの転写因子（GATA-2, SCL, AML1）の発現レベルを定量的 PCR および免疫染色法にて検討している。これまでに再生不良性貧血の造血幹細胞における特定の遺伝子の発現を定量的 PCR 法にて検討した研究はなく、本研究は方法論として独自性を有するのは勿論であるが、その対象遺伝子として造血幹細胞にて機能する転写因子に注目したその視点が極めて斬新といえる。結果として再生不良性貧血症例の CD 34 陽性細胞において GATA-2 遺伝子の発現の有意な低下が認められた。この発現の低下は正常骨髓、特発性血小板減少性紫斑病、骨髓異形成症候群などの対照群では認められなかった。また再生不良性貧血の CD 34 陽性細胞における SCL, AML1 遺伝子の発現レベルはこれら対照群と変わりなく、GATA-2 遺伝子の発現低下は極めて特異的であった。CD 34 陽性細胞集団の purity, heterogeneity など検討すべき点は残るものの、造血幹細胞の発生、維持に必須である転写因子の特異的な発現異常を明らかにしたこの研究結果は、再生不良性貧血の発症機序を解明する上で極めて新しい知見である。今後、対象症例の蓄積だけでなく、同一症例における経過中、特に免疫抑制剤前後での GATA-2 遺伝子の発現の変化と臨床所見との相関、また再生不良性貧血症例における GATA-2 遺伝子の多型の存在などを明らかにする必要があるが、本研究の結果により、少なくとも GATA-2 遺伝子が再生不良性貧血治療における直接的な治療対象となり得る可能性が示唆された。特に免疫抑制剤が無効で、現時点で有効な治療法がない再生不良性貧血患者にとっては新たな治療法の確立は大きな福音であり、その糸口となり得る本研究は大変意義が深く、学位に十分値すると思われる。